

MUTANTES INDUCIDAS DEL SISTEMA *SalI*: ESTUDIOS DE REGULACIÓN Y SU POSIBLE APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

Castelán-Vega, J. A.¹; M. R. Rodicio²; Peláez, A. I.² & R. M. Ribas-Aparicio^{1*}

1. Laboratorio de Producción y Control de Biológicos, Departamento de Microbiología, ENCB-IPN. Prol. Carpio y Plan de Ayala s/n Col. Casco Santo Tomás, Del. Miguel Hidalgo; México, D. F. C. P. 11340. Fax 0157296207.

2. Universidad de Oviedo, España *ribas@redipn.ipn.mx

Palabras clave: *SalI*, mutantes, *Streptomyces*.

Introducción. Los sistemas de restricción-modificación (RM) están formados por genes potencialmente letales para la célula que los contiene, por ello es indispensable una estrecha regulación de sus componentes para que el sistema pueda ser mantenido en el hospedero. El sistema RM *SalI* de *Streptomyces albus* G está formado por dos genes estructurales¹: *salIR*, que codifica la endonucleasa (ENasa), precediendo a *salIM* que codifica la metiltransferasa (MTasa). Hasta ahora no se ha descubierto el mecanismo por el cual este sistema es regulado; sin embargo, evidencia experimental en nuestro grupo de trabajo ha demostrado el requerimiento del gen *salIM* para conseguir actividad endonucleolítica².

El objetivo de este trabajo fue estudiar la regulación del sistema *SalI* empleando mutantes específicas de *M. SalI* para determinar si el sitio activo de la MTasa está implicado funcional o estructuralmente en la expresión y/o activación de la ENasa,

Metodología. Análisis previos de la secuencia aminoacídica de *M. SalI* han sugerido que el tetrapéptido NPPY (asparagina-prolina-prolina-tirosina) forma el sitio activo de esta enzima; de acuerdo a las características de estos aminoácidos, cuatro mutantes fueron creadas: N131A (cambio asparagina por alanina), Y134F (tirosina por fenilalanina), N131G (asparagina por glicina) y N131S (cambio asparagina por serina). Estas mutantes se construyeron empleando mutagénesis mediada por PCR y fueron clonadas en *E. coli* y *S. lividans*.

Las actividades de modificación que presentaron las mutantes y el gen silvestre fueron evaluadas *in vitro* mediante digestión con la enzima *SalI* recombinante del DNA extraído de las diferentes clonas obtenidas.

Resultados y Discusión. La evaluación del fenotipo de modificación *in vitro* mostró que las mutantes N131A y N131G son catalíticamente inactivas mientras que para Y134F y N131S se observa una actividad similar a la del gen *salIM* silvestre, tanto en el huésped heterólogo *E. coli* como en el homólogo *S. lividans*. Un resultado semejante al obtenido para la mutante Y134F se encontró también en la metiltransferasa del grupo y *M. TaqI*³ y corrobora la necesidad de un anillo aromático en la estabilización de compuestos intermediarios formados durante la metilación. Los resultados obtenidos para la mutante N131S, aunados al de las mutantes N131A y N131G apoyan la participación del residuo asparagina en la actividad catalítica, estableciendo contactos con la adenina a metilar para activar su grupo amino y favorecer la transferencia del grupo metilo³.

Por otra parte, el gen *salIR* pudo ser clonado en *S. lividans* sin necesidad de que su genoma estuviera previamente modificado

por *M. SalI*, hecho que está de acuerdo con la necesidad de *salIM* para conseguir la actividad endonucleolítica. Adicionalmente, no fue posible obtener cotransformantes viables con las mutantes N131A y N131G y el gen *salIR*, pero sí se obtuvieron en el caso de las mutantes Y134F y N131S. Esto implica fuertemente que la actividad reguladora de *M. SalI* es independiente de la actividad catalítica. Estos resultados nos dan la posibilidad de emplear este sistema y sus mutantes catalíticamente inactivas para construir vehículos de clonación de genes con selección directa en *Streptomyces* (fig. 1), el cual es un microorganismo de gran importancia biotecnológica pues es fuente de diversos metabolitos de gran aplicación.

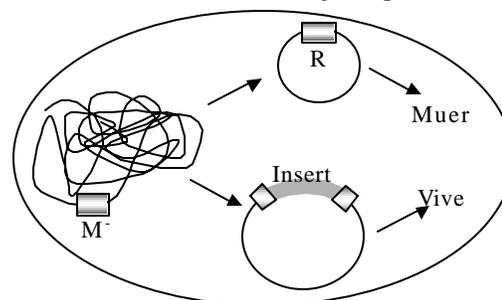


Figura 1. Sistema de selección directa para la clonación de genes de interés biotecnológico en *Streptomyces*. *M*, MTasa catalíticamente inactiva, *R*, *R. SalI*.

Conclusiones. El tetrapéptido NPPY forma el sitio activo de *M. SalI* y la actividad reguladora de esta enzima es independiente de su actividad catalítica; con las mutantes catalíticamente inactivas y el gen *salIR* silvestre se pueden construir vectores de clonación útiles en *Streptomyces*.

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado por la CGPI-IPN con clave 990237 y por el CONACyT clave 31675N. Castelán-Vega J.A. es becario del CONACyT y del PIFI-IPN. Ribas-Aparicio R. M. es becaria de EDD-IPN, COFAA-IPN y miembro del SNI-CONACyT

Bibliografía.

1. Rodicio, M. R. y K. F. Chater. (1988). The *SalI* (*SalGI*) restriction-modification system of *Streptomyces albus* G. *Gene*, 74: 39-42.
2. Gómez, A. 1996. Estudios de regulación y de expresión heteróloga del sistema de restricción-modificación *SalI*, de *Streptomyces albus* G. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo, España.

3. Schluckebier, G.; Labahn, J.; Granzin, J. y Saenger, W. 1998. *M.TaqI*: Possible catalysis via cation- π interactions in N-specific DNA methyltransferases. *Biol Chem.* 379(4-5): 389-400.